ODREĐIVANJE RELATIVNOG OPORAVKA INDIKATORSKIH MIKROORGANIZAMA ESCHERICHIA COLI U UZORCIMA MORSKE VODE ZA KUPANJE KORIŠTENJEM TBX AGARA KAO MEDIJA ZA UZGOJ

Aljinović, Ante

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:382389

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

Ante Aljinović

ODREĐIVANJE RELATIVNOG OPORAVKA INDIKATORSKIH MIKROORGANIZAMA *ESCHERICHIA COLI* U UZORCIMA MORSKE VODE ZA KUPANJE KORIŠTENJEM TBX AGARA KAO MEDIJA ZA UZGOJ

Diplomski rad

Split, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ EKOLOGIJA I ZAŠTITA MORA

ODREĐIVANJE RELATIVNOG OPORAVKA INDIKATORSKIH MIKROORGANIZAMA *ESCHERICHIA COLI* U UZORCIMA MORSKE VODE ZA KUPANJE KORIŠTENJEM TBX AGARA KAO MEDIJA ZA UZGOJ

Diplomski rad

Predmet: Ekologija mora

Mentor:
Prof. dr. sc. Mladen Šolić

Komentor:
Dr.sc. Slaven Jozić

Student:
Ante Aljinović

Split, srpanj 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Ekologija i zaštita mora

Diplomski rad

ODREĐIVANJE RELATIVNOG OPORAVKA INDIKATORSKIH MIKROORGANIZAMA *ESCHERICHIA COLI* U UZORCIMA MORSKE VODE ZA KUPANJE KORIŠTENJEM TBX AGARA KAO MEDIJA ZA UZGOJ

Ante Aljinović

Sažetak

Budući da se TBX agar uspješno koristi za određivanje i brojenje vrste *Escherichia coli* u mikrobiologiji hrane pomoću tehnike brojanja kolonija, sa ili bez uporabe membranskih filtera, ideja je bila ispitati je li ga moguće koristiti za određivanje i brojenje navedene vrste u uzorcima mora za kupanje. U ovom radu prikazani su rezultati primjene metode membranske filtracije za brojanje *E. coli* u uzorcima mora za kupanje koristeći TBX agar. Za testnu metodu su korišteni različiti mediji: TBX agar, jednoslojni MMGA i TBX agar te dvoslojni MMGA/TBX agar. Za određivanje temeljnih značajki TBX agara, različiti volumeni prirodnih uzoraka su filtrirani i inkubirani na odabranom mediju i različitim uvjetima inkubacije. Rezultati pokazuju da pre-inkubacija u blažim uvjetima (36±2°C) i na neselektivnom mediju (MMGA) značajno povećava oporavak bakterijskih stanica, što rezultira većim brojem *E. coli*. Inkubacija pri 44±0.5°C na dvoslojnom MMGA/TBX agaru sa 6-satnom preinkubacijom pri 36±2°C te naizmjenična inkubacija, 4-satna preinkubacija na MMGA pri 36±2°C praćena 20-satnom inkubacijom na TBX pri 44± 0.5°C, rezultirali su prihvatljivim relativnim oporavkom *E. coli*. Postignute kategoričke značajke su prihvatljive pa bi se oba postupka mogla koristiti za određivanje i brojenje *E. coli* u uzorcima mora za kupanje.

(30 stranica, 24 slike, 4 tablice, 19 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: TBX agar, more za kupanje, *Escherichia coli*, relativni oporavak, kategoričke performanse

Mentor: Prof. dr. sc. Mladen Šolić

Komentor: Dr. sc. Slaven Jozić

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Zvjezdana Popović Perković

2. Dr. sc. Slaven Jozić

3. Prof. dr. sc. Mladen Šolić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Ecology and protection of the sea

MSc Thesis

IS TBX AGAR A SUITABLE MEDIUM FOR MONITORING *ESCHERICHIA COLI* IN BATHING WATER USING THE MEMBRANE FILTRATION METHOD?

Ante Aljinović

Abstract

Since TBX agar has been successfully used for *E. coli* detection and enumeration in food microbiology by colony counting technique, with or without using membrane filters, the idea was to examine whether it could be used to detect and enumerate *E. coli* in bathing seawater samples. This paper presents the results of the membrane filtration method for counting *E. coli* in seawater samples using TBX agar. Different media were used for test method: TBX agar, single-layered MMGA and TBX agar, and double-layered MMGA/TBX agar. To determine the basic performance characteristics of TBX agar, different volumes of natural samples were filtered and incubated on the selected medium under different incubation conditions. The results suggested that pre-incubation in mild conditions (36±2°C) on non-selective medium (MMGA) significantly increases the recovery of bacterial cells, resulting in higher number of *E. coli*. Incubation at 44±0.5°C on double-layered MMGA/TBX with 6-hour pre-incubation at 36± 2°C and alternate incubation, 4-hour pre-incubation on MMGA at 36±2°C followed by 20-hour incubation on TBX at 44±0.5°C, resulted in acceptable relative recovery of *E. coli*. The achieved performance characteristics are acceptable and both procedures could be used for *E. coli* detection and enumeration in bathing seawater samples.

(30 pages, 24 figures, 4 tables, 19 references, original in: Croatian)

Keywords: TBX agar, bathing water, *Escherichia coli*, relative recovery, categorical performances

Supervisor: Mladen Šolić, PhD / Full Professor

Co-supervisor: Slaven Jozić, PhD

Reviewers: 1. Zvjezdana Popović Perković, PhD / Assistant Professor

2. Slaven Jozić, PhD

3. Mladen Šolić, PhD / Full Professor

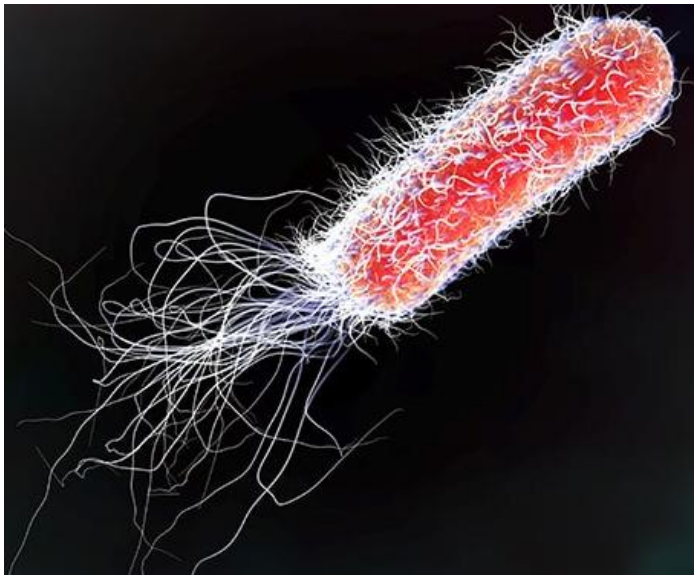
SADRŽAJ:

1. UVOD 1
1.1. Dosadašnja istraživanja 1
1.2. Svrha i ciljevi rada 3
2. MATERIJALI I METODE 5
2.1. Uzorkovanje i spajkanje 5
2.2. Analiziranje uzoraka 7
2.3. Određivanje relativnog i stvarnog oporavka 8
2.4. Određivanje kategoričkih značajki 10
2.5. Utjecaj stresa na oporavak *Escherichiae coli* 13
2.6. Utjecaj inhibicijskih tvari na oporavak *Escherichiae coli* 14
2.7. Analiza podataka 15
3. REZULTATI I RASPRAVA 16
3.1. Određivanje relativnog i stvarnog oporavka 16
3.2. Određivanje kategoričkih značajki metode 25
4. ZAKLJUČCI 28
5. LITERATURA 29

1. UVOD

1.1. Dosadašnja istraživanja

Europska direktiva o kakvoći voda za kupanje (BWD 2006/7/EC) usvojena je 15. veljače 2006. Svrha Direktive je zaštita, očuvanje i poboljšanje kvalitete okoliša te zaštita ljudskog zdravlja. Temelji za procjenu kakvoće voda za kupanje su rezultati praćenja dva mikrobiološka pokazatelja (indikatora): *Escherichia coli* (Slika 1) i crijevni enterokoki.



Slika 1. Bakterija *E. coli* (izvor: https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/)

Ovisno o rezultatima praćenja pokazatelja, voda za kupanje svrstava se u jednu od četiri kategorije kakvoće: izvrsna, dobra, zadovoljavajuća, nezadovoljavajuća (Slika 2).

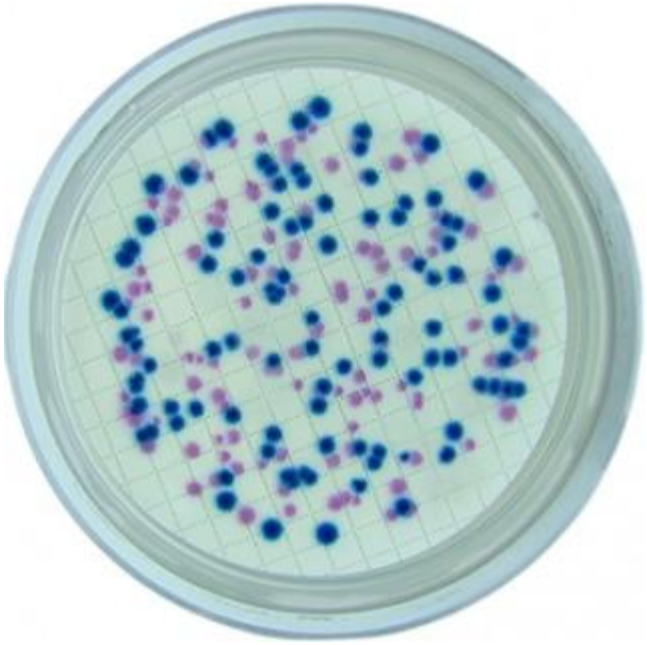
Pokazatelj	Izvrsna	Dobra	Zadovoljavajuća	Nezadovoljavajuća
crijevni enterokoki (bik/100 ml)	≤100*	≤200*	≤185**	>185**(2)
Escherichia coli (bik/100 ml)	≤150*	≤300*	≤300**	>300**(2)

Slika 2. Standardi za ocjenu kakvoće mora (izvor: baltazar.izor.hr)

U slučaju da se kakvoća mora za kupanje ocijeni kao „nezadovoljavajuća“, država članica mora istražiti uzroke i razloge nemogućnosti postizanja barem „zadovoljavajuće“ kakvoće te poduzeti prikladne mjere kako bi umanjila, spriječila i uklonila uzroke onečišćenja. Za dobivanje pouzdanih podataka o razini *E. coli* i crijevnih enterokoka, a time i pouzdanu

procjenu kakvoće vode za kupanje, važno je korištenje odgovarajućih metoda za brojanje navedenih pokazatelja. Direktiva navodi dvije referentne ispitne metode za određivanje broja *E. coli* u uzorcima vode za kupanje, a to su ISO 9308-3 (minijaturna metoda (MMPN)) i ISO 9308-1 (metoda membranske filtracije (MF)). U skladu s Direktivom, države članice mogu dopustiti laboratorijima upotrebu drugih, alternativnih metoda, ako mogu dokazati da su dobiveni rezultati ekvivalentni onima dobivenim pomoću referentnih metoda. Metoda membranske filtracije koja se koristila prilikom uvođenja Direktive sastojala se od dva neovisna testa, standardnog i brzog testa. *E. coli* je bila definirana kao laktoza pozitivna, oksidaza negativna i indol pozitivna koliformna bakterija (standardni test) te kao bakterija koja može tvoriti indol iz triptofana sadržanog u čvrstom mediju (brzi test). Oba testa su bila prikladna za dezinficiranu vodu i druge vode za piće s niskim brojem bakterija, ali su mogla biti primjenjivana i na druge vrste voda, pod uvjetom da suspendirana tvar ili pozadinska flora ne ometaju filtraciju, uzgoj i brojenje (ISO 2000).

Revidirana standardna metoda membranske filtracije (ISO 9308-1:2014) drastično se razlikuje od prethodne. Između ostalih promjena, nedavno revidirana referentna metoda definira *E. coli* kao pripadnicu obitelji enterobakterija koja posjeduje enzime β-D-galaktozidazu i β-D-glukuronidazu. Osim toga, druge vrste voda osim vode za piće nisu uključene u područje primjene metode. Zbog niske selektivnosti kromogenog koliformnog agara (CCA) (Slika 3), ISO je preporučio ovu metodu prvenstveno za vode u kojima se očekuje mali broj bakterija (manje od 100 ukupnih kolonija po filtru).



Slika 3. CCA agar s uzgojenom *Escherichia coli* (modro obojenje) i pozadinskom bakterijskom florom (ružičasto obojenje) (izvor: http://www.atropos.gr/en/chromogenic-coliform-agar-cca/)

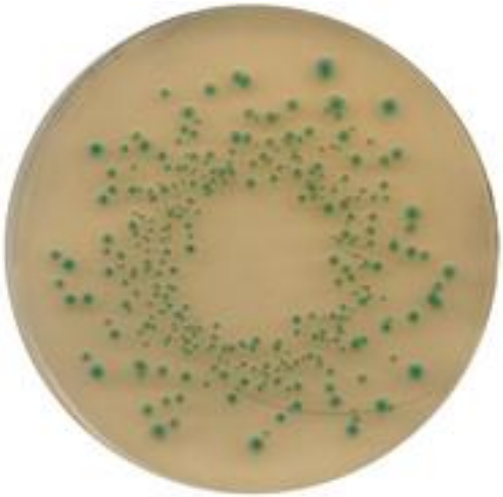
Prema tome, standardna metoda više nije prikladna za praćenje kakvoće mora za kupanje, čime se dovodi u pitanje upotreba metode membranske filtracije za praćenje (monitoring) *E. coli* u području primjene Direktive.

S obzirom da ISO trenutno ne navodi niti jednu metodu membranske filtracije koja je prikladna za praćenje *E. coli* u površinskim vodama, Tehnički odbor ISO-a 147 - Pododbor 4 (TC147 / SC4) potiče prijedloge nacionalnih tijela država članica u obliku „preliminarnih prijedloga za metodu“ ili „prijedloga za novu metodu“. Prije prihvaćanja i objavljivanja, svaka nove predložena metoda mora biti validirana u skladu s važećim standardom ISO 13843 (EMEG 2016). Slijedeći navedeni zahtjev, Hrvatska je uspješno validirala temperaturno modificiranu metodu ISO 9308-1:2014 povećanjem temperature inkubacije standardne metode na 44± 0,5°C, nakon 4-5 satnog perioda oživljavanja pri 36±2°C (Jozić i Vukić Lušić, 2018; Jozić i sur., 2018). Metoda je odobrena od strane Europske komisije kao alternativna metoda za praćenje hrvatskih obalnih i kopnenih voda za kupanje (Ares (2018) 3712489 - 12/07/2018), čime je Hrvatska postala prva članica EU kojoj je odobrena upotreba vlastite razvijene metode.

1.2. Svrha i ciljevi rada

Osim CCA medija, drugi kromogeni medij, Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) agar, godinama se uspješno koristi za otkrivanje i brojanje vrste *E. coli*. S obzirom da je u seriji ISO 16649 TBX agar uspješno korišten za određivanje i brojenje *E. coli* u hrani pomoću tehnike brojanja kolonija (plate count), sa ili bez uporabe membrana, ideja je bila ispitati je li ga moguće koristiti u metodi membranske filtracije, čime bi se ponudila još jedna alternativna metoda svim laboratorijima koji sudjeluju u praćenju mikrobiološke kakvoće mora za kupanje.

U ovom radu prikazani su rezultati primjene metode membranske filtracije za brojenje *E. coli* u uzorcima mora za kupanje, korištenjem TBX agara kao medija za uzgoj (Slika 4).



Slika 4. TBX agar s uzgojenom *Escherichia coli* (izvor: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/TBX-Tryptone-Bile-X-glucuronide-agar,MDA_CHEM-116122)

Namjera nije bila provedba potpune validacije metode, već samo određivanje temeljnih karakteristika, relativnog oporavka (relative recovery) i kategoričkih značajki (categorical performances) TBX agara, sa i bez preinkubacije (oživljavanja) na neselektivnom mediju.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje i spajkanje

Prirodno onečišćeni uzorci mora za kupanje (početni uzorci) prikupljeni su u standardnim staklenim bocama zapremine 2 L, a ciljana su područja gdje je očekivano umjereno mikrobiološko onečišćenje. Uzorci su dostavljani u laboratorij u rashladnoj kutiji unutar jednog sata od uzorkovanja. Da bi se procijenio broj ciljanih bakterija u uzorcima, analizirani su različiti volumeni (decimalna razrjeđenja) uzoraka korištenjem temperaturno modificirane metode ISO 9308-1 (Jozić i sur., 2018). Uzorci su potom pohranjivani pri 4°C preko noći (Slika 5). Nakon inkubacije, koncentracija *Escherichiae coli* u uzorcima je procijenjena množenjem broja tipičnih kolonija *E. coli* na CCA podlogama koje su sadržavale 20-80 ciljanih kolonija po membrani, s razrjeđenjem uzorka.



Slika 5. Mikrobiološki inkubator (izvor: http://www.tamiko.hr/panasonic-biomedical.php)

Uzorci za spajkanje pripremljeni su pomoću čistih kultura i otpadne vode. Spajkanje je dodavanje kontaminiranog materijala (referentnog materijala sa živim bakterijama, prirodne onečišćene vode, sanitarne vode) u čistu vodu radi pripreme umjetnog uzorka. Standardni sojevi *E. coli* uzgojeni su preko noći na TSA podlozi (Slika 6).



Slika 6. TSA podloga sa uzgojenom *Escherichia coli* (izvor: https://laboratoryinfo.com/tryptic-soy-agar/)

Jedna kolonija je otopljena u epruveti koja je sadržavala sterilnu 0,9% fiziološku otopinu. Koncentracija *E. coli* u suspenziji procijenjena je metodom epifluorescentne mikroskopije (Porter i Feig, 1980) (Slika 7). Suspenzija je razrijeđena do približno $1x10^3$ CFU *E. coli*/mL i dodana u bocu sa sterilnom slatkom vodom kako bi se dobilo željenu koncentraciju *E. coli* u testnim uzorcima.



Slika 7. Epifluorescentni mikroskop na IOR-u (izvor: http://acta.izor.hr/wp/epifluorescentni-mikroskop/)

Otpadna voda decimalno je razrijeđena sterilnom slatkom vodom, analizirana kako bi se odredila koncentracija *E. coli* te potom pohranjena pri 4°C preko noći. Testni uzorci s ciljanom koncentracijom *E. coli* pripremljeni spajkanjem sterilne morske vode sa željenim volumenom otpadne vode. Svi uzorci i sterilna voda (morska voda) korišteni za pripremu ispitnih uzoraka aklimatizirani su na sobnu temperaturi dva sata prije razrjeđivanja kako bi se izbjegao mogući bakterijski stres uzrokovan iznenadnom promjenom temperature.

2.2. Analiziranje uzoraka

Svi uzorci filtrirani su koristeći membranske filtere promjera 47 mm i veličine pora 0,45 µm, koristeći aparaturu za membransku filtraciju sa 6 mjesta i dvostruki set staklenih lijevaka (Slika 8).



Slika 8. Aparatura za membransku filtraciju (izvor: https://www.rocker.com.tw/product-3.asp?ser=1045&ser2=Laboratory%20Filtration)

Nakon filtracije, lijevci su isprani sterilnom deioniziranom vodom. Filteri su zatim polagani na podloge i inkubirani. Kada je filtrirano manje od 30 mL uzorka, dodavano je približno 30 mL sterilne deionizirane vode u lijevak za filtriranje prije dodavanja uzorka. Prilikom filtriranja za različite podloge u isto vrijeme, filteri su naizmjenično polagani na drugu podlogu kako bi se smanjio potencijalni učinak različite propusnosti držača filtera na rezultate (Slika 9).



Slika 9. Aparatura membranske filtracije i držači filtera (plavo obojeni) (izvor: http://tr.starlabsci.com/300ml-glass-3-branches-vacuum-filters_p77.html)

2.3. Određivanje relativnog i stvarnog oporavka

Relativni oporavak određen je prema ISO 17994:2014, uspoređujući TBX agar s CCA podlogom inkubiranom kao što je opisano u Jozić i sur. (2018). Modificirana CCA metoda odabrana je kao referentna metoda umjesto standardne ISO 9308-1:2014, jer je upotrebom modificirane metode omogućeno ispitivanje šireg raspona broja *E. coli*, s obzirom na to da je standardna metoda karakterizirana vrlo niskom selektivnošću (oko 16%) i posljedično vrlo niskom gornjom radnom granicom (do 100 ukupnih kolonija). Osim toga, prema European Microbiology Expert Group (EMEG), standardna metoda ISO 9308-1:2014 više se ne može koristiti za praćenje *E. coli* u vodama za kupanje u Europskoj uniji (EMEG, 2016).

Istraživanje je provedeno tijekom i nakon sezone kupanja 2018. godine. Uzorci su prikupljeni na 10 različitih lokacija u Kaštelanskom zaljevu (Slika 10).



Slika 10. Kaštelanski zaljev (izvor: https://www.google.com/maps/@43.527493,16.3889106,10569m/data=!3m1!1e3)

Kako bi se postigao najbolji relativni oporavak na TBX agaru, testirani su različiti uvjeti inkubacije. Temperatura inkubacije bila je 44±0,5°C, sa ili bez perioda oživljavanja pri 36±2°C (0, 4 ili 6 sati). Za testnu metodu su korištene različite kombinacije podloga: TBX agar, jednoslojni MMGA (modificirani glutamatni agar s mineralima) i TBX agar, te dvoslojni MMGA/TBX agar. Gornji 1 mm debeli sloj dvoslojnog MMGA/TBX agara pripreman je izlijevanjem 2,5 ml malo toplijeg (50°C) MMGA u 60 mm petrijeve zdjelice koje sadrže ohlađeni TBX agar debljine 4 mm. U ispitivanjima relativnog oporavka, uvijek je korišten jedan dan star dvoslojni MMGA/TBX agar.

Radni uzorci pripremljeni su razrjeđivanjem početnih uzoraka sterilne morske vode da bi se dobila koncentracija *E. coli* cca 100 CFU/100 mL. Da bi se dobio širok raspon broja *E. coli*, ispitivana su do tri različita volumena istih radnih uzoraka (iz iste boce), po jedna replika za svaku ispitivanu podlogu i jedna za CCA. Sve ploče su inkubirane 24 h pri zadanim uvjetima inkubacije. Procjena relativne razlike (x_i) izračunata je za svaki par rezultata (a_i, b_i) koristeći jednadžbu 1:

$$x_i = [ln(a_i) - ln(b_i)] * 100$$

a_i - broj *Escherichia coli* dobiven na CCA (CFU *E. coli* / filter)

b_i - broj *Escherichia coli* dobiven na ispitivanoj podlozi (CFU *E. coli* / filter)

Polovica raspona intervala pouzdanosti (W) izvedena je iz standardne devijacije srednje relativne razlike ($s_{\bar{x}}$), koristeći faktor pokrivenosti k = 2 (jednadžba 2). Interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti izračunat je jednadžbom 3 za donju granicu (X_L) i jednadžbom 4 za gornju granicu (X_U).

$$W = ks_{\bar{x}} = \frac{2s}{\sqrt{n}}$$

$$X_L = \bar{x} - W$$

$$X_U = \bar{x} + W$$

S - standardna devijacija relativne razlike

n - broj uzoraka

$\bar{\boldsymbol{x}}$ - srednja relativna razlika

Prema ISO 17994:2014, dvije metode se kvantitativno ne razlikuju ako se srednja relativna razlika uparenih rezultata ne razlikuje značajno od nule, a interval pouzdanosti ne prelazi unaprijed određenu granicu. Unaprijed određena granica za vode za kupanje je 2L = 20%, kao što su preporučili Pitkänen i sur. (2008).

Stvarni oporavak *E. coli* na ispitivanoj podlozi određivan je testom na čistim kulturama. U sterilnu slatku vodu dodavan je jedan od tri soja *E. coli*, *E. coli* WDCM 00012, *E. coli* WDCM 00013 i *E. coli* WDCM 00202. Uzorci za svaku kulturu filtrirani su u 6 replika i inkubirani na Tryptic soy agaru (TSA) (4 h period oživljavanja), jednoslojnim MMGA i TBX agaru (4 h period oživljavanja) i dvoslojnom MMGA/TBX agaru (6 h period oživljavanja). Stupanj oporavka za svaki soj izračunat je kao omjer prosječnog broja *E. coli* dobivenog na ispitivanoj podlozi i TSA, pomnožen sa 100.

2.4. Određivanje kategoričkih značajki

Da bi se odredile kategoričke značajke TBX agara, različiti volumeni prirodnih uzoraka su filtrirani i inkubirani na odabranoj podlozi i zadanim uvjetima inkubacije. Za potvrdu su odabrane samo ploče s približno 20-60 dobro odvojenih kolonija (najmanje 10 kolonija *E. coli*). Sve kolonije iz svake ploče su prebačene na TSA i inkubirane preko noći pri 36±2°C.

Izolati su zatim potvrđivani pomoću niza sekundarnih identifikacijskih testova: Gram bojenje, oksidaza test, test aktivnosti β-D-galaktozidaze i β-D-glukuronidaze. Za testove aktivnosti β-D-galaktozidaze i β-D-glukuronidaze korišten je Colilert-18 supstrat (IDEXX). Supstrat je otopljen u 100 ml sterilne deionizirane vode te aseptički raspodijeljen u sterilne epruvete po 4 mL. Epruvete su nacijepljene kulturom dobivenom iz izoliranih kolonija te potom inkubirane 24 sata pri 35±0.5°C. Zamućenje i žuto obojenje podloge potvrda je aktivnost β-D-galaktozidaze dok je aktivnost β-D-glukuronidaze dokazivana plavom fluorescencijom podloge na UV svjetlu valne dužine 366 nm (Slika 11).



Slika 11. Plava fluroescencija dokazuje aktivnost β-D-glukuronidaze, a time i vrstu *Escherichia coli* (izvor: https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert-18/)

Svi lažno pozitivni i lažno negativni izolati, kada su uspoređivani rezultati potvrdnih testova i karakteristike kolonije s testne podloge, dodatno su testirani pomoću API 20E identifikacijskog kita (Slika 12).



Slika 12. API 20E identifikacijski kit (izvor: https://www.mediray.co.nz/laboratory/shop/molecular-and-microbiology-reagents/microbiology-reagents/api-kits-and-reagents/api-20-e/)

Ovisno o rezultatima sekundarnih identifikacijskih testova, podatci su podijeljeni su u četiri kategorije (Slika 13):

a) Stvarni pozitivni - broj tipičnih kolonija čiji je identitet potvrđen sekundarnim identifikacijskim testovima;

b) Lažni negativni - broj atipičnih kolonija koje su identificirane kao ciljani organizmi sekundarnim identifikacijskim testom;

c) Lažni pozitivni - broj tipičnih kolonija za koje je sekundarnim identifikacijskim testom naknadno dokazano da nisu ciljani organizmi;

d) Stvarni negativi - broj atipičnih kolonija za koje se sekundarnim identifikacijskim testom dokazalo da nisu ciljni organizmi;



Slika 13. Kategorije podataka ovisno o rezultatima sekundarnih identifikacijskih testova (izvor: https://slideplayer.com/slide/14964386/)

Kategoričke značajke izračunate su na slijedeći način:

Osjetljivost = a / (a + b)

Specifičnost = d / (c + d)

Stopa lažno pozitivnih = c / (a + c)

Stopa lažno negativnih = b / (b + d)

Selektivnost = a / n

Učinkovitost (E) = (a + d) / (a + b + c + d)

2.5. Utjecaj stresa na oporavak *Escherichiae coli*

Za ispitivanje učinka stresa uzrokovanog medijem (morska voda) na razliku u oporavku *E. coli* pomoću CCA i TBX agara, sterilna voda iz slavine i sterilna morska voda (slanost 35 PSU) spajkani su kanalizacijskom vodom i pohranjeni u mraku pri 20°C 96 sati. Broj uzgojivih *E. coli* praćen je uzimanjem i ispitivanjem pod uzoraka, u triplikatu, 30 minuta nakon spajkanja i zatim u intervalima od 24 sata.

Utjecaj stresa uzrokovanog sunčevim zračenjem, na razliku u oporavku *E. coli* pomoću CCA i TBX agara ispitan je izlaganjem prozirne staklene boce od 2 L, koja sadrži prirodni uzorak morske vode, umjerenom sunčevom zračenju tijekom 45 minuta. Poduzorci su uzeti i analizirani u triplikatima, u intervalima od 10 ili 15 minuta. Za sve eksperimente, razlika u oporavku dvaju medija za isti poduzorak izračunata je pomoću jednadžbe 5:

$$Diff.(\%) = \left(\frac{CCA - TBX}{CCA}\right) * 100$$

Diff. - razlika u oporavku CCA i TBX medija izražena u %

CCA - srednja vrijednost *Escherichia coli* u poduzorku dobivenom na CCA (CFU / filter)

TBX - srednja vrijednost *Escherichia coli* u poduzorku dobivenom na TBX agaru (CFU / filter)

2.6. Utjecaj inhibicijskih tvari na oporavak *Escherichiae coli*

Testiran je učinak obaju standardnih tvari za inhibiranje Gram-pozitivnih bakterija, žučne soli br. 3 i Tergitol 7 (Slika 14), na oporavak *E. coli*.



Slika 14. Boca Tergitola 7 (izvor: https://www.mymicrolab.com/tegritol--7-agar-base-48)

Prirodni uzorci morske vode filtrirani su u šest replika i inkubirani na CCA koji sadrže različite koncentracije žučnih soli br. 3: 0,00%, 0,075% (polovica standardne koncentracije) i 0,15% (standardna koncentracija). Uzorci pripremljeni pomoću sterilne slatke vode s čistom kulturom *E. coli* filtrirani su šest replika i inkubirani na Tryptic soy agaru (TSA) koji sadrži različite koncentracije žučnih soli br. 3 (0.00, 0.075 i 0.15%) i Tergitola 7 (0.00, 0.0075 i 0.015%). Obje podloge, CCA i TSA inkubirane su 4 h pri 36±2°C, nakon čega je uslijedila inkubacija od 20 sati pri 44±0,5°C.

2.7. Analiza podataka

Za obradu podataka i izradu grafova korišteni su programski paketi Statistica © ver. 9.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA, 2009) i MS Excel 2013.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Određivanje relativnog i stvarnog oporavka

Rezultati relativnog oporavka *Escherichiae coli* u uzorcima morske vode korištenjem TBX agara inkubiranog u različitim uvjetima prikazani su u Tablici 1. Odlučili smo da je relativni oporavak prihvatljiv kada je srednja relativna razlika bila nula ili niža od nule.

Tablica 1. Relativni oporavak *Escherichia coli* korištenjem dvije različite podloge (TBX agar i dvoslojni MMGA /TBX agar) pri 44 ± 0,5°C sa i bez 4-satnog perioda oživljavanja pri 36 ± 2°C ($\bar{x}$ - srednja relativna razlika (RD), SD - standardna devijacija RD-a, X - vrijednost RD-a na donjoj (L) i gornjoj (U) granici pouzdanosti)

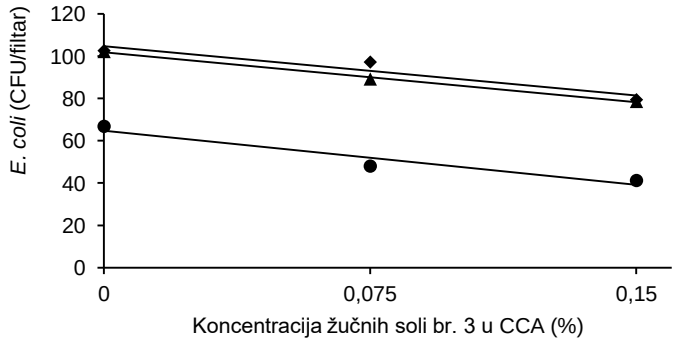
	TBX agar		Dvoslojni MMGA/TBX agar	
	Bez perioda oživljavanja	S periodom oživljavanja	Bez perioda oživljavanja	S periodom oživljavanja
Parametar	(n=31)	(n=31)	(n=31)	(n=31)
$\bar{x}$	32.5	16.7	19,9	6.5
SD	27.8	36.2	27.8	25.8
X_L	22,5	3.7	9.9	-2.7
X_U	42.5	29.7	29.9	15.8

Relativni oporavak *E. coli* na TBX agaru inkubiranom 24 sata pri 44±0,5°C nije bio zadovoljavajući. Značajno je poboljšan korištenjem 4-satnog perioda oživljavanja ili dvoslojnog MMGA/TBX agara, ali ni dalje nije bio zadovoljavajući. Najbolji relativni oporavak dobiven je korištenjem dvoslojnog MMGA/TBX agara i 4-satnog perioda oživljavanja. Rezultati upućuju na to da pre-inkubacija u blažim uvjetima (36±2°C) i na neselektivnom mediju (MMGA) značajno povećava preživljavanje bakterijskih stanica, što rezultira većim brojem *E. coli*. Bez obzira na uvjete inkubacije, srednja relativna razlika bila je značajno viša od nule, što ukazuje na bolji oporavak *E. coli* na CCA nego na TBX i dvoslojnom MMGA/TBX agaru. Značajno veći oporavak *E. coli* na CCA nego na dvoslojnom MMGA/TBX agaru s 4-satnim periodom preživljavanja utvrdili su i Vukić Lušić i sur. (2016).

Veća srednja relativna razlika zabilježena u njihovoj studiji (26,4%) u usporedbi s onom dobivenom u ovom istraživanju (6.5%) može se objasniti činjenicom da CCA medij u njihovom istraživanju nije inkubiran pri višoj temperaturi (44±0,5°C) već pri 36±2°C tijekom cijelog perioda inkubacije, kako je definirano u metodi ISO 9308-1:2014.

Razlog za značajno niži relativni oporavak na TBX agaru može se djelomično objasniti sastavom podloge. Dok TBX agar sadrži samo tripton, interakcija odabranih peptona, piruvata, sorbitola i fosfatnog pufera sadržanih u CCA potiče brz rast kolonija, čak i za subletalno oštećene koliformne bakterije (Tehnički podatci za kromokultni koliformni agar, EMD Millipore). Nadalje dok proizvođači CCA medija navode da Tergitol 7, komponenta koju se koristi kao inhibitor za Gram-pozitivne bakterije, nema negativan učinak na rast *E. coli*, postoje indicije da žučne soli br. 3, inhibirajuće komponente sadržane u TBX agaru, mogu utjecati na rast *E. coli* (Stersky i Hedrick 1972; Bonadonna i sur. 2007). U svrhu testiranja mogućeg negativnog učinka obje inhibirajuće komponente, provedena su dodatna istraživanja, kako je opisano u materijalima i metodama.

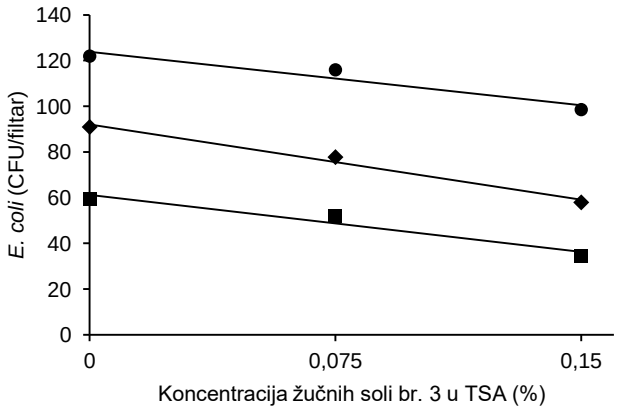
Učinak dodavanja žučnih soli u CCA na rast *E. coli* prikazan je na slici 15.



Slika 15. Utjecaj koncentracije žučnih soli u CCA na rast *E. coli* (krug-WDCM 00202, kvadrat-WDCM 00012 i romb-WDCM 00013)

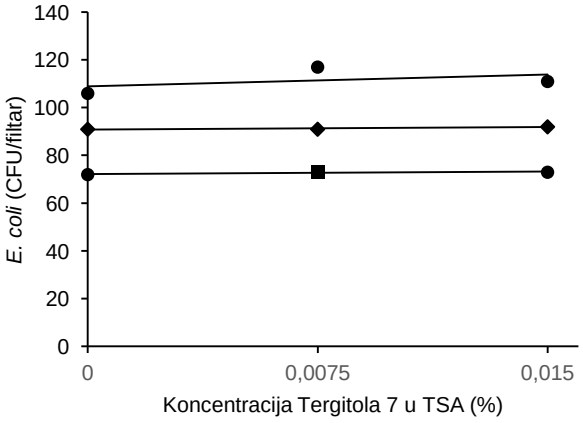
U sva tri eksperimenta, srednji broj *E. coli* linearno se smanjivao s koncentracijom žučnih soli u podlozi. Standardna koncentracija žučnih soli (0,15%) značajno je smanjila broj *E. coli* (22-38%). S obzirom na to da CCA sadrži Tergitol 7, ovakvo značajno smanjenje broja uzgojivih *E. coli* ne može se pripisati isključivo učinku žučnih soli, već i njihovom potencijalnom kumulativnom učinku s Tergitolom 7. Kako bi testirali pojedinačni učinak žučnih soli i Tergitola 7 na rast *E. coli*, provedena su istraživanja s čistim kulturama, inokulacijom tri soja *E. coli* na TSA koja je sadržavala različite koncentracije žučnih soli i

Tergitola 7. Srednja vrijednost *E. coli* također se linearno smanjivala s koncentracijom žučnih soli, a standardna koncentracija žučnih soli od 0,15% smanjila je rast *E. coli* za 19-60% (Slika 16).



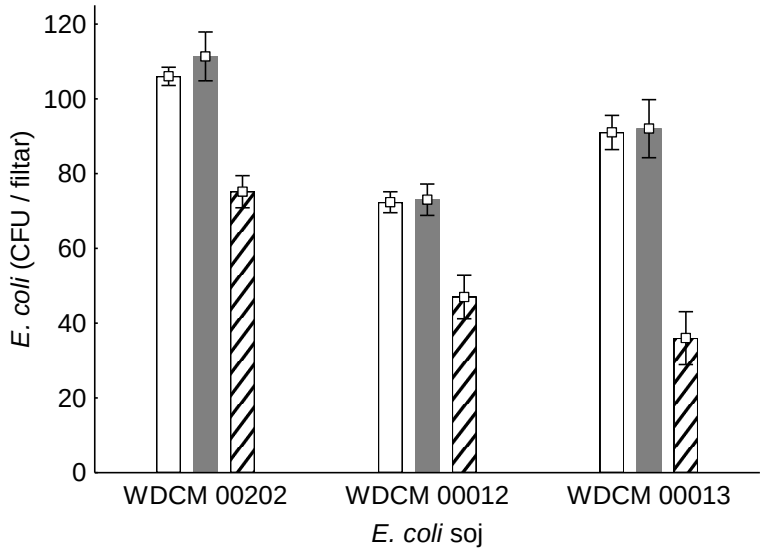
Slika 16. Utjecaj koncentracije žučnih soli u TSA na rast triju sojeva *E. coli* (krug-WDCM 00202, kvadrat-WDCM 00012 i romb-WDCM 00013)

Nije zabilježeno smanjenje srednje vrijednosti *E. coli* na TSA pločama, neovisno o koncentraciji Tergitola 7 (Slika 17).



Slika 17. Utjecaj koncentracije Tergitola 7 u TSA na rast triju sojeva *E. coli* (krug-WDCM 00202, kvadrat-WDCM 00012 i romb-WDCM 00013)

Dodatak Tergitola 7 rezultirao je manjim i povišenijim kolonijama, koje su bile bolje razdvojene i lakše ih je bilo brojiti. Usporedba učinaka standardne koncentracije žučnih soli br. 3 i Tergitola 7 na rast bakterije *E. coli* prikazana je na slici 18.



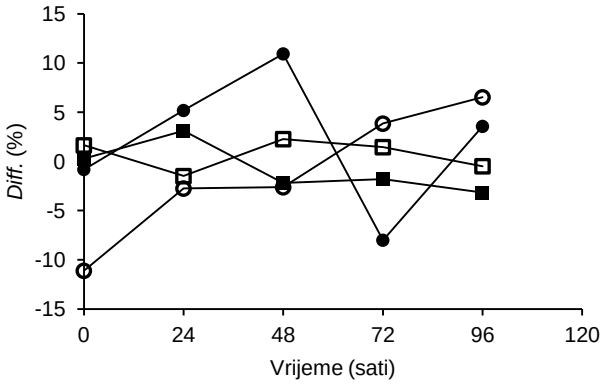
Slika 18. Usporedba rasta (srednja vrijednost ± SD) triju sojeva *E. coli* na TSA (bijeli stupići), TSA koji sadrži standardnu koncentraciju žučnih soli br. 3 (iscrtkani stupići) i Tergitola 7 (sivi stupići)

Očigledan negativan učinak žučnih soli na rast *E. coli* može biti mogući razlog za dobivanje značajno nižih brojnosti *E. coli* na TBX agaru nego na CCA.

Negativni učinak žučnih soli na koliformne bakterije nije nova spoznaja, poznata je već desetljećima. Stersky i Hendricks (1972) pronašli su negativnu korelaciju između koncentracija žučnih soli u SPC (Standard Plate Count) agaru i rasta triju različitih sojeva *E. coli*, s gotovo potpunim inhibiranjem pri koncentraciji žučnih soli br. 3 od 0,1%. Nađeno je značajno niže inhibiranje (7-57%) za SPC agar koji sadrži do 0.01% Tergitola 7. Scheusner i sur. (1971) utvrdili su da je negativni učinak žučnih soli na rast *E. coli* izraženiji kod tretiranih (ozlijeđenih) bakterija nego u netretiranih. Postotak *E. coli* koji nije rastao na MA (Minimal agar) koji sadrži 0,15% žučne soli br. 3 povećao se s 20% za netretirane stanice na 65% za stanice tretirane 60 sekundi dezinficijensom (metilalkilbenziltrimetil amonijev klorid). Kao kontrola, rast tretiranih bakterija na mediju bez dodanih žučnih soli smanjio se za samo 10%, u usporedbi s brojem netretiranih stanica.

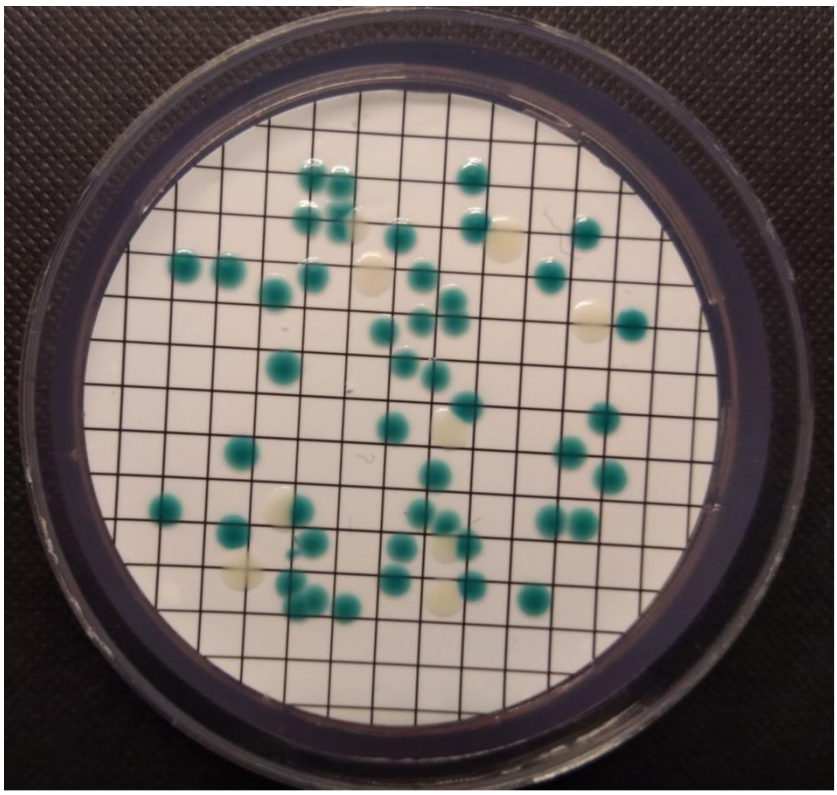
Budući da TBX agar sadrži žučne soli, čiji je negativni učinak izraženiji kod ozlijeđenih bakterija (Scheusner i sur., 1971), također smo ispitali utječe li stupanj staničnog stresa na razliku u oporavku *E. coli* na TBX agaru i CCA, koji ne sadrži žučne soli.

Provedena su četiri pokusa u mraku, dva sa slatkom i dva s morskom vodom. Tijekom 96 sati eksperimenta za morsku i slatku vodu nije pronađena jasna tendencija razlike (Diff.) između srednjih vrijednosti dobivenih za CCA i TBX agar (Slika 19).

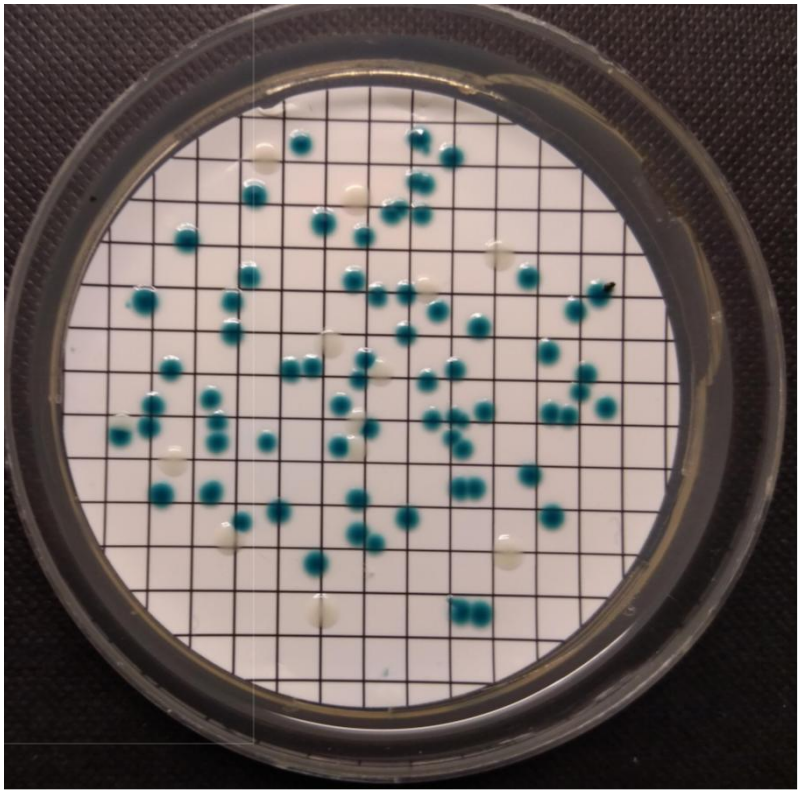


Slika 19. Utjecaj vremena izlaganja različitim medijima (krug = slatka voda, kvadrat = morska voda) na razliku u brojnosti *E. coli* (Diff.) dobivenih na CCA i TBX agaru

Za morsku vodu razlika je bila relativno stabilna, s malim varijacijama (±3%). Utvrđene su značajnije razlike za slatku vodu (±11%). Bilo je vrlo teško očitavati ploče (CCA i TBX) za poduzorke uzete nakon 72 i 96 sati čuvanja. Znatno se povećao broj malih prozirnih kolonija pozadinske bakterijske flore, a ciljane kolonije su bile nepravilne, spljoštene s nepravilno valovitim rubovima (Slika 20 i Slika 21).

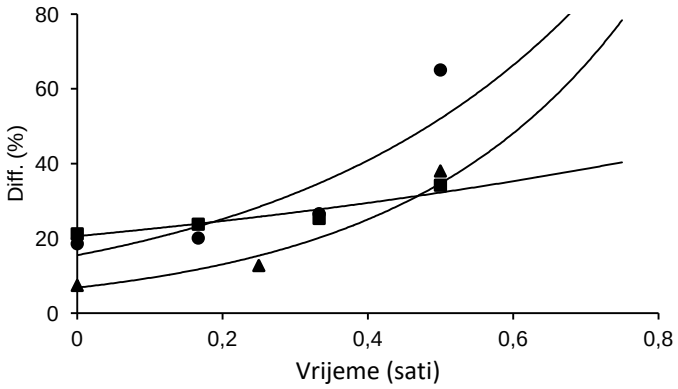


Slika 20. Kolonije *E. coli* (svijetlo-zelene kolonije) na dvoslojnom MMGA/TBX agaru i kolonije pozadinske bakterijske flore (prozirne kolonije)



Slika 21. Kolonije *E. coli* (modre kolonije) na jednoslojnom TBX agaru i kolonije pozadinske bakterijske flore (prozirne kolonije)

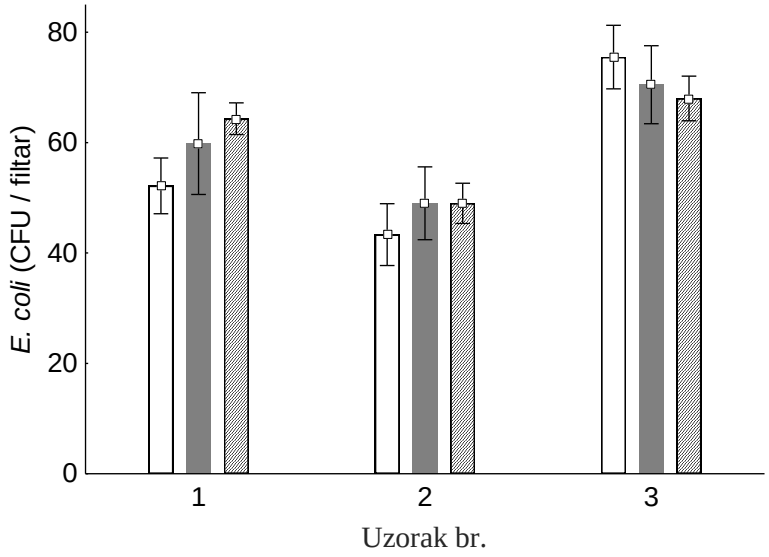
Prema ISO 17994:2014, može biti prikladno utjecati na mikrobnu populaciju uzoraka koje se koristi u studiji ekvivalentnosti (usporedbe metoda) kako bi simulirali stvarne situacije na koje se nailazi u rutinskoj laboratorijskoj praksi. Takve modifikacije mogu uključivati primjenu različitih raspona temperature ili utjecaja dnevne svjetlosti, kako bi se simulirali različiti okolišni uvjeti iz kojih uzorci mogu potjecati. S obzirom da je sunčevo zračenje najvažniji čimbenik koji uzrokuje bakterijski stres u prirodnim uvjetima, značajno nadmašujući učinak drugih biotičkih i abiotičkih čimbenika (Chandran i Hatha, 2003; Jozić i sur., 2014), eksperimenti provedeni u prisutnosti sunčeve svjetlosti dali su jasnije rezultate. Eksperimenti su izvedeni oko 11 sati ujutro po lokalnom vremenu, s prosječnom jakošću sunčevog zračenja od 500 Wm^{-2}. Razlika u srednjim vrijednostima *E. coli* (Diff.) pokazala je jasnu tendenciju porasta s vremenom izlaganja sunčevoj svjetlosti, do 65% (Slika 22).
Uzimajući u obzir da vrijeme izlaganja odgovara stresu koji trpe bakterijske stanice, rezultat bi mogao ukazivati da je CCA medij bolji u pogledu oporavka stanica *E. coli* u usporedbi s TBX agarom. Ovaj rezultat je vrlo važan pri dizajniranju i provođenju studija ekvivalentnosti metoda jer naglašava važnost korištenja prirodnih uzoraka koji su bili izloženi utjecaju okolišnih čimbenika ili uzoraka koji su namjerno izloženi čimbenicima okoline, kako bi se dobili pouzdani podatci.



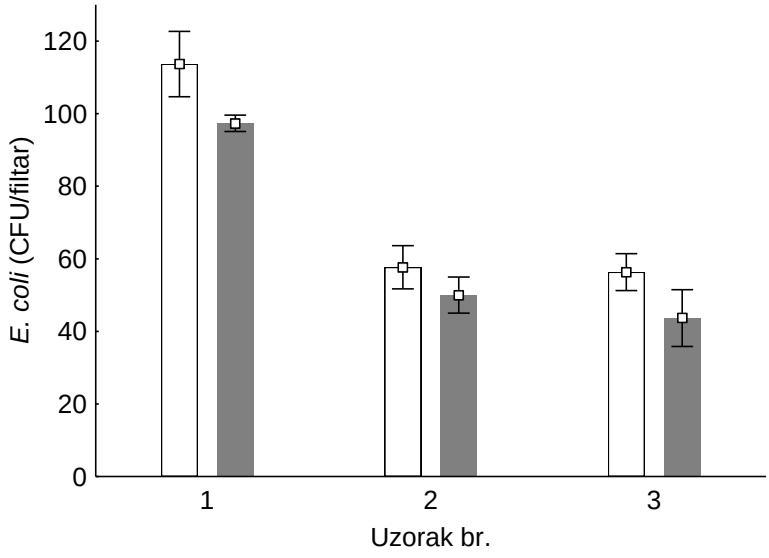
Slika 22. Utjecaj vremena izlaganja triju prirodnih uzoraka morske vode sunčevoj svjetlosti na razliku u broju *Escherichia coli* (Diff.) dobivenih na CCA i TBX agaru

Kako je srednja relativna razlika između ISO 9308-1:2014 i temperaturno modificirane ISO-9308-1 bila -3,65% (Jozić i sur., 2018), relativni oporavak TBX agara i MMGA/TBX agara mogao bi se dodatno poboljšati. Stoga smo testirali bi li dulji period oživljavanja (5 i 6 h) pri 36±2°C na dvoslojnom MMGA/TBX agaru ili naizmjeničnoj inkubaciji na jednoslojnom MMGA i TBX agaru (inkubacija na TBX agaru nakon oživljavanja na MMGA) s 4-satnim periodom oživljavanja, mogao poboljšati relativni oporavak *E. coli*. Tri različita uzorka morske vode filtrirali smo i inkubirali na dvoslojnom MMGA/TBX agaru, šest replika za sva tri perioda oživljavanja (četiri, pet i šest sati). Nadalje, tri različita uzorka morske vode filtrirali smo i inkubirali u šest replika na dvoslojnom MMGA/TBX agaru, sa 6-satnim periodom oživljavanja i jednoslojnom MMGA i TBX agaru (naizmjeničnom inkubacijom) s 4-satnim periodom oživljavanja. Studentov t-test nije pokazao značajnu statističku razliku u srednjim vrijednostima između 4- i 5-satnog perioda oživljavanja na dvoslojnoj podlozi (Slika 23).Utvrđena je statistički značajna razlika u srednjim vrijednostima između 4- i 6-satnog perioda oživljavanja, dok između 5- i 6-satnog perioda preživljavanja nije utvrđena statistički značajna razlika. U jednom eksperimentu, srednja vrijednost broja bakterija iz neobjašnjivih razloga značajno se smanjila.

U sva tri eksperimenta, naizmjenična inkubacija na MMGA i TBX agaru sa 4-satnim periodom oživljavanja rezultirala je značajno većim brojem *E. coli* nego na dvoslojnom MMGA/TBX agaru inkubiranom sa 6-satnim periodom oživljavanja (Slika 24). To bi moglo biti posljedica difuzije žučnih soli iz TBX sloja u MMGA i njihovog negativnog učinka na rast *E. coli*.



Slika 23. Utjecaj perioda oživljavanja (4h = bijeli stupići, 5h = sivi stupići, 6h = iscrtkani stupići) na rast *E. coli* (srednja vrijednost ± SD) na dvoslojnom MMGA/TBX agaru



Slika 24. Usporedba rasta (srednja vrijednost ± SD) *Escherichia coli* na naizmjenično inkubiranom jednoslojnom MMGA i TBX agaru (bijeli stupići) i dvoslojnom MMGA/TBX agaru (sivi stupići)

Na temelju gore navedenih rezultata, testirali smo relativni oporavak dvoslojnog MMGA/TBX medija sa 6-satnim periodom oživljavanja, naizmjenično inkubiranog MMGA i TBX agara s 4-satnim periodom oživljavanja i, kao kontrolu, TBX agar sa 6- satnim periodom oživljavanja.

Produženi period oživljavanja značajno je poboljšao relativni oporavak na TBX agaru, ali nedovoljno da se dostigne relativni oporavak na CCA. I MMGA/TBX agar sa 6-satnim periodom oživljavanja i naizmjenično inkubirani MMGA i TBX agar s 4-satnim periodom oživljavanja dali su slične rezultate; značajno poboljšan i prihvatljiv relativni oporavak, čak i bolji od oporavka referentnom metodom (Tablica 2).

Tablica 2. Relativni oporavak dobiven korištenjem dvije različite podloge (TBX agar i dvoslojni MMGA/TBX agar) sa 6-satnim periodom oživljavanja i jednoslojnog MMGA i TBX agara s 4-satnim periodom oživljavanja ($\bar{x}$- srednja relativna razlika (RD), SD - standardna devijacija RD-a, X - vrijednost RD-a na donjoj (L) i gornjoj (U) granici pouzdanosti)

	6 h period oživljavanja		4 h period oživljavanja
	TBX	Dvoslojni MMGA/TBX	Jednoslojni MMGA i TBX agar
Parametar	n=45	n=45	n=32
$\bar{x}$	7.94	-4.77	-8.27
SD	26.54	27.72	19.92
X_L	0.02	-13.03	-15.54
X_U	15.85	3.49	-0.99

Znači da se oba postupka, inkubacija na dvoslojnoj podlozi i naizmjenična inkubacija na dvije pojedinačne podloge, mogu koristiti za dobivanje pouzdanih podataka o *E. coli* u monitoringu mora za kupanje. Budući da svi podatci o relativnim razlikama za jednoslojne i dvoslojne podloge nisu dobiveni istodobno, koristeći iste uzorke, razlika u relativnom oporavku koristeći navedene postupke ne može se procijeniti pomoću podataka srednje relativne razlike prikazanih u tablici 2. Rezultati usporedbe uparenih podataka za *E. coli* na jednoslojnoj i dvoslojnoj podlozi dobivenih u istovremenoj analizi 25 uzoraka, pokazali su nešto bolji oporavak na jednoslojnom mediju, sa srednjom relativnom razlikom od 3,22%.

Stvarni oporavak postignut u eksperimentima s tri čiste kulture bio je zadovoljavajući i bolji u postupku korištenjem naizmjenične inkubacije na MMGA i TBX agaru. Stupanj oporavka na jednoslojnom MMGA i TBX agaru bio je u rasponu od 89-120%, sa srednjom vrijednošću od 103%, a za dvoslojni MMGA/TBX agar u rasponu od 73-100%, s prosječnom vrijednošću od 89%.

Pri odlučivanju koji postupak primijeniti, moglo bi biti važno uzeti u obzir ne samo relativan oporavak, već i složenost postupka, npr. koji postupak je lakše primijeniti i koje je ploče lakše očitavati. Naizmjenična inkubacija rezultira manjim, povišenim, ne-sluzavim i dobro obojenim kolonijama, koje je lako brojiti. Manje kolonije obično znače višu gornju radnu granicu metode. Kolonije uzgojene na dvoslojnom agaru su veće, uzdignute, ponekad manje obojene i prekrivene prozirnim sluzavim materijalom, i vjerojatno rezultiraju nižom gornjom radnom granicom metode. Nadalje, postupak naizmjenične inkubacije je skuplji i zahtijeva više vremena od inkubacije na dvoslojnoj podlozi zbog korištenja dvije različite ploče i potrebe za ručnim prebacivanjem svakog filtera s MMGA na TBX agar nakon perioda oživljavanja. Za razliku od naizmjenične inkubacije, korištenje dvoslojne podloge pojednostavljuje postupak inkubacije zbog mogućnosti korištenja programiranih inkubatora. Jedino potencijalno ograničenje može biti svježina dvoslojne podloge, s obzirom da tijekom skladištenja komponente iz jednog medija mogu difundirati u drugi. Stoga smo testirali i je li svježina dvoslojne podloge utječe na relativni oporavak. Tri različita uzorka morske vode filtrirana su i inkubirana u pet replika na 24, 48, 72 i 96 sati starom dvoslojnom MMGA/TBX agaru, koristeći 6-satni period oživljavanja. Nije nađena statistički značajna razlika između rezultata dobivenih na podlogama različite starosti ($p > 0,05$).

3.2. Određivanje kategoričkih značajki metode

Uzimajući u obzir i rezultate relativnog oporavka i složenost postupka, odlučili smo odrediti kategoričke značajke dvoslojnog MMGA/TBX agara inkubiranog pri 44±0,5°C sa 6-satnim periodom oživljavanja pri 36±2°C. U pet uzoraka određene su i značajke TBX agara sa 6-satnim periodom oživljavanja, kako bi se utvrdilo utječe li pre-inkubacija na neselektivnom mediju na selektivnost postupka.

Postignute značajke dvoslojnog MMGA/TBX agara su prihvatljive u usporedbi sa zahtjevima ISO 13843:2017 (tablica 3).

Rezultati pokazuju da je postupak dovoljno osjetljiv (97,4%), specifičan (95,6%), selektivan (69,9%) i učinkovit (96,9%) za određivanje *E. coli* u moru za kupanje. Selektivnost izračunata za pet uzoraka koji su istodobno inokulirani i inkubirani na TBX agaru i TBX/MMGA, nisu pokazali značajan učinak dodavanja neselektivnog MMGA sloja na selektivnost podloge (Tablica 4). Istodobno je taj sloj odigrao ključnu ulogu u postizanju prihvatljivog relativnog oporavka stanica *E. coli* (Tablica 3).

Tablica 3. Kategoričke značajke dvoslojnog MMGA/TBX pri 44 ± 0,5°C, s 6-satnim periodom oživljavanja pri 36±2°C

Značajka	Medij
	More za kupanje (n=326)
Osjetljivost (%)	97.4
Specifičnost (%)	95.6
Stopa lažno pozitivnih (%)	2.4
Stopa lažno negativnih (%)	5.6
Selektivnost (%)	69.9
Učinkovitost (%)	96.9

Tablica 4. Usporedba selektivnosti TBX agara i dvoslojnog MMGA/TBX agara inkubiranog pri 44 ± 0,5°C sa 6-satnim periodom oživljavanja pri 36±2°C

	Selektivnost	
Medij	TBX	Dvoslojni MMGA/TBX
More za kupanje	53.5 (n=200)	53.5 (n=198)

Selektivnost nije konstanta specifična za metodu; značajno varira zbog sezonskih učinaka i drugih uzroka koji mijenjaju relativnu brojnost ciljane i pozadinske mikroflore (ISO/TR 2000). S obzirom da selektivnost MMGA/TBX agara u ovom istraživanju i selektivnost CCA pokazanom od Jozić i sur. (2018) nije određeni korištenjem istih uzoraka i tijekom iste sezone, bolja selektivnost MMGA/TBX agara mogla bi se dijelom pripisati različitom omjeru ciljanih i ne-ciljanih bakterija u uzorcima. Selektivnost izračunata korištenjem nepotvrđenih kultura s prikladnih filtera (ukupni broj kolonija od 20-60 CFU; najmanje 10 CFU *E. coli*) dobivena istovremenom analizom na CCA, jednoslojnom i dvoslojnom agaru tijekom ispitivanja relativnog oporavka, pokazala je ovisnost o podlozi i iznosila je 82,6%, 89,7% odnosno 81,8%.

Kako je selektivnost CCA bila znatno viša od one koju su utvrdili Jozić i sur. (2018), moglo bi se zaključiti da je ovisna o sezoni i uzorcima.

Naizmjenična inkubacija na jednoslojnom MMGA i TBX agaru pokazala je nešto bolju selektivnost od dvoslojnog MMGA/TBX agara. To nije rezultat bolje inhibicije ne ciljanih bakterija, nego i bolji oporavak (veći broj) ciljanih stanica *E. coli*, a time i veća selektivnost.

4. ZAKLJUČCI

Period oživljavanja pri 36±2°C značajno je poboljšao relativni oporavak *Escherichiae coli* na TBX agaru, ali nedovoljno da se dostigne oporavak postignut na CCA.

Poboljšanje relativnog oporavka postignuto je oživljavanjem na neselektivnom, MMGA/TBX agaru, ali i dalje nedovoljno da bi bilo prihvatljivo.

Značajno poboljšan i prihvatljiv relativni oporavak postignut je produženim periodom oživljavanja (6 h) na dvoslojnom MMGA/TBX agaru i naizmjeničnom inkubacijom na MMGA i TBX agaru s 4-satnim periodom oživljavanja pri 36±2°C.

Istovremenom analizom 25 uzoraka na jednoslojnim i dvoslojnim podlogama, utvrđen je nešto bolji oporavak na jednoslojnom mediju, sa srednjom relativnom razlikom od 3,22%.

Stvarni oporavak postignut u pokusima s tri čiste kulture bio je zadovoljavajući i bolji u postupku korištenjem naizmjenične inkubacije na MMGA i TBX agaru. Stupanj oporavka na jednoslojnom MMGA i TBX agaru bio je u rasponu od 89-120%, sa srednjom vrijednošću od 103%, a za dvoslojni MMGA/TBX medij u rasponu od 73-100%, s prosječnom vrijednošću od 89%.

Naizmjenična inkubacija na jednoslojnom MMGA i TBX agaru rezultira manjim, povišenim, ne-sluzavim i dobro obojenim kolonijama, koje je lako brojati. Kolonije koje se uzgajaju na dvoslojnom mediju veće su, podignute, ponekad manje obojene i prekrivene prozirnim sluzavim materijalom.

Rezultati su pokazali da je medij dovoljno osjetljiv (97,4%), specifičan (95,6%), selektivan (69,9%) i učinkovit (96,9%) za određivanje *E. coli* u moru za kupanje.

5. LITERATURA

Bonadonna L, Cataldo C, Semproni M. 2007. Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. Desalination, 213, 18-23.

Chandran A, Hatha AAM. 2003. Survival of *Escherichia coli* in a tropical estuary. The South Pacific Journal of Natural Science, 21, 41-46.

Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of the European Union, L 64, 37-51.

European Microbiology Expert Group (EMEG). 2016. EMEG Outline Paper, European microbiology bathing water expert sub-group, 30th September 2016. Dostupno sa: https://circabc.europa.eu/sd/a/9710f5b5-c1fa-47a0-962c-5e2150677f3e/EMEG%20BW%20E%20%20coli%20Outline%20Paper_30-09-2016.pdf, pristupljeno: siječanj, 2019.

Hachich EM, Di Bari M, Christ APG, Lamparelli CC, Ramos SS, Sato MIZ. 2012. Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. Brazilian Journal of Microbiology, 43(2), 675-681.

ISO 9308-1. 2000. Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO/TR 13843. 2000. Water quality – Guidance on validation of microbiological methods International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 9308-1. 2014. Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora (ISO 9308-1:2014; EN ISO 9308-1:2014). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 17994. 2014. Water quality – Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO 13843. 2017. Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jozić S, Morović M, Šolić M, Krstulović N, Ordulj M. 2014. Effect of solar radiation, temperature and salinity on the survival of two different strains of *Escherichia coli*. Fresenius Environmental Bulletin, 23(8), 1852-1859.

Jozić S, Vukić Lušić D. 2018. Report on validation of temperature modified ISO 9308–1:2014 method for the enumeration of *Escherichia coli* in bathing water samples in Croatia. Split: Institute of Oceanography and Fisheries.

Jozić S, Vukić Lušić D, Ordulj M, Frlan E, Cenov A, Diković S, Kauzlarić V, Fiorido Đurković L, Stilinović Totić J, Ivšinović D, Eleršek N, Vucić A, Peroš-Pucar D, Unić Klarin B, Bujas L, Puljak T, Mamić M, Grilec D, Jadrušić M, Šolić M. 2018. Performance characteristics of the temperature-modified ISO 9308-1 method for the enumeration of *Escherichia coli* in marine and inland bathing waters. Marine Pollution Bulletin, 135, 150-158.

Payment P, Waite M, Dufour A. 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. In: Dufour A, Snozzi M, Koster W, Bartram J, Ronchi E, Fewtrell L, (Eds.). Assessing microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods (pp. 47-77). London: IWA Publishing.

Pitkänen T, Kalso S, Rapala J, Koskentalo H, Tuhkalainen T, Luoma A, Laamanen V, Airaksinen P, Niemelä Seppo I. 2008. *Escherichia coli* methods for bathing water - Results of a Finnish equivalence trial. Helsinki: National Public Health Institute.

Porter KG, Feig YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnology and Oceanography, 25, 943-948.

Scheucher DL, Busta FF, Speck MK. 1971. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. Applied Microbiology, 21(1), 46-49.

Stersky AK, Hendrick TI. 1972. Inhibition of growth of airborne coliforms and other bacteria on selective media. Journal of Milk and Food Technology. 35(3), 156-162.

Vukić Lušić D, Jozić S, Cenov A, Glad M, Bulić M, Lušić D. 2016. *Escherichia coli* in marine water: Comparison of methods for the assessment of recreational bathing water samples. Marine Pollution Bulletin, 113 (1-2), 438-443.